

# Exposure assessment of phenolic xenoestrogens released from plastic materials

学位名	博士（薬学）
学位授与機関	星薬科大学
学位授与年度	2004年度
学位授与番号	32676乙第143号
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1240/00000346/">http://id.nii.ac.jp/1240/00000346/</a>

氏名（本籍）	井之上 浩一	（千葉県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙第143号	
学位授与年月日	平成16年9月8日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	Exposure Assessment of Phenolic Xenoestrogens Released from Plastic Materials	
論文審査委員	主査 教授 中澤 裕之	
	副査 教授 鈴木 勉	
	副査 教授 中 陳 静 男	

## 論文内容の要旨

### 1. はじめに

我々は多くの合成化学物質を合目的に創り、10万種以上の物質が日常生活で汎用されている。便利で快適な現代生活を享受している一方で、化学物質による生体影響が危惧されている。1996年、Colbornらは、新たなヒト健康影響のリスク評価概念として、環境に放出された化学物質の中には、内分泌系をかく乱し、様々な影響を及ぼすと提唱した<sup>1)</sup>。すなわち、発癌性等の毒性試験だけでは、その危険性を予知できないと考えられ、精度の高いリスク評価が要求されている。

中でも、多くの研究成果に基づいて、高分子素材に由来するフェノール性化学物質は、日常生活用品に汎用される上、内分泌かく乱化学物質として疑われている。特に「優先してリスク評価に取り組む物質のリスト（環境省）」<sup>2)</sup>で挙げられているビスフェノール A (BPA) 及びノニルフェノール (NP) は、エストロゲン活性作用を示す等の報告があり、早急にリスク評価を実施しなければならない化学物質である。しかし、そのヒト暴露量の評価は、様々な暴露媒体が存在すること、測定環境下からの汚染が危惧されること等により困難を極めている。

本研究では、BPA 及び NP について、高精度な微量分析法を開発し、暴露量の評価を検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1. 試薬

本実験に用いた BPA、NP 及び各種安定同位体標準品は、環境分析用グレードを用いた。また、移動相には HPLC 又は LC-MS 用高純度アセトニトリルを利用し、試料の前処理及びガラス器具等の洗浄には、残留農薬分析用メタノール等を使用した。

### 2.2. 機器分析装置

BPA 及び NP の生体試料及び食品等の微量分析には、液体クロマトグラフ/電気化学検出計（LC-ED：Coul Array 6210）及び液体クロマトグラフ/質量分析計（LC-MS：Agilent 1100 MSD-SL system 等）を用いた。

### 2.3. 暴露媒体の分析

空気、水、食事媒体における化学物質濃度を算定して、間接的な暴露量の評価を検討した。更に、高濃度レベルの暴露として、食品用容器・包装資材（食品用缶コーティング材及びラップフィルム）についても分析法を開発し、リスク評価を実施した。

### 2.4. 生体試料の分析

BPA の生体試料の分析には、血清、血漿、精漿及び尿を用い、NP では血清及び尿について測定した。また、尿中 BPA 及び NP の測定に関しては、それらの抱合体についても検討した。これらの検体は、分析に供するまで -80°C において保存した。

### 3. 結果及び考察

#### 3.1. 分析手法の開発

BPA、NP 共に特異的検出手法である LC-ED を用いた結果、検出限界値 ( $S/N=3$ ) は、0.5 pg 及び 50 pg であった。しかし、LC-ED を生体試料等の分析に展開した場合、夾雑物質により分析精度に影響を及ぼす上、保持時間のみで定性分析を実施するのでは信頼性の高い分析結果が得られない。そこで、生体試料及び室内空気に LC-MS の応用を試み、エレクトロスプレーイオン化法を検討した結果、ネガティブモードにおいて脱プロトンイオンを検出した。BPA 及び NP をシングルイオンにより測定した際の検出限界値は、0.5 pg 及び 10 pg であった。また、重水素及び  $^{13}\text{C}$  安定同位体による内標準法を利用することで測定精度が著しく向上した。更なる高感度な生体試料の分析には、前処理としてのクリーンアップ及び濃縮が必要とされた。そこで、BPA の前処理には、利便性、経済性等を考慮して逆相分配や分子サイズを分離モードとする固相抽出法を検討した結果、添加回収率は、70%以上であった。尿中 NP の分析では、実験室内空気等のコンタミネーションが危惧されたため、カラムスイッチングを駆使したオンライン抽出法を構築することで汚染を低減させた分析手法を開発した。その結果、添加回収率は 85%以上であった。

#### 3.2. 暴露量の算出と問題点

空気経由の暴露については、一般人が過ごす生活環境に着目し、アクティブサンプリング法による室内空気の採取 (7 L/min、24 時間) を検討した。室内空気を採取後、LC-MS により測定した結果、BPA 及び NP は、平均 0.7 ng/m<sup>3</sup> 及び 97.6 ng/m<sup>3</sup> であった。一方、LC-ED を用いて飲料水中の BPA 及び NP 濃度を測定した結果、0.08 ng/mL 及び 0.04 ng/mL が検出された。食事における暴露量の推定値は、報告されている平均 BPA 摂取量 0.55 µg/day (陰膳方式)<sup>2)</sup> 及び

平均 NP 摂取量 7.5  $\mu\text{g/day}$  (トータルダイエツト方式)<sup>3)</sup>を用い、各媒体から一日平均暴露量を体重 50 kg として算出した結果、約 14 ng/kg/day (BPA) 及び 180ng/kg/day (NP) となった。

以上のようにして、算出した一日平均暴露量は、日常生活で汎用される高分子製食品用器具容器・包装資材等からの暴露が反映されていない。そこで、缶コーティングやラップフィルムによる食事摂取を考慮した結果、いずれも上記の一日平均暴露量に比較して 10～100 倍の高い値となった。

### 3.3. 生体試料の分析による暴露量評価

BPA 及び NP については、様々な暴露経路が存在するため、従来の間接的な手法では、過少評価してしまう可能性が考えられる。そこで、ヒト生体試料の分析を応用した直接的な暴露量の評価を試みた。

ヒトに対して BPA 及び NP を経口投与した際、体内動態として第Ⅱ相反応が主に進行し、24 時間以内に 80%以上が尿に排泄されることから、測定対象を尿及び血液とした<sup>4,5)</sup>。更に BPA においては、精子減少等の男性生殖系への影響も懸念されることから、精漿も測定対象とした。LC-MS によるヒト生体中の BPA を分析した結果、いずれの血液、尿、精漿からも検出されなかったが、尿試料では、抱合体を一部の健常人から 0.1～0.5 ng/mL の範囲で測定された。健常人の一日尿量を 1.5 L とした場合、BPA 暫定暴露量は 3～15 ng/kg/day と推測された。

NP に関しては、健常人の尿試料を分析した結果、殆どが定量限界 (0.3 ng/mL) 以下であったが、抱合体として 1.0 ng/mL が検出された。この数値を用いて、NP 暫定暴露量を算出した結果、約 30 ng/kg/day となった。更にボランティア 3 名にラップフィルムを用いた食事後、尿を分析した結果、15.9～110.9 ng/mL の NP 抱合体が検出され、暫定暴露量は約 500～3,000 ng/kg/day となった。これらの結果から、様々な媒体が存在したとしても当該化学物質の生体濃度レベルを

把握すれば、正確な暫定暴露量を算出できると考えられる。

本研究で構築された分析法及び得られた知見は、疾病との因果関係の究明を目的とした疫学調査や毒性試験との学際的且つ総括的な研究の一助となり、化学物質に対するヒトのリスク評価を実施する上で大きく寄与するものと期待できる。

#### 4. 引用文献

- 1) T.Colborn, D. Dumanoski, J. Peterson “*Our Stolen Future*” Dutton NY. (1996)
- 2) 環境省環境保健部 [<http://www.env.go.jp/chemi/end/index2.html>]
- 3) K. Guenther, V. Heinke, B. Thiele, E. Kleist, H. Prast, T. Raecker, *Environ. Sci. Technol.* 36, 1676-1680 (2002)
- 4) S. Müller, P. Schmid and C. Schlatter, *Environ. Toxicol. Pharm.* 5, 257-265 (1998)
- 5) W. Volkel, T. Colnot, G.A. Csanady, J.G. Filser, W. Dekant, *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1281-1287 (2002)

## 論文審査の結果の要旨

1996年、新たなヒト健康影響のリスク評価概念として、環境中に放出された化学物質の中には、内分泌系を攪乱し、様々な生体影響を及ぼす可能性が指摘された。その後、これらの化学物質は、Endocrine Disrupting Chemicals（EDCs 内分泌攪乱化学物質）として注目されるようになり、関連の研究は環境化学分野に留まらず、毒性学、生化学、臨床化学、予防医学領域で展開されている。中でも、合成高分子素材に由来する化学物質は、日常生活用品に汎用される上、内分泌攪乱作用を有する可能性が指摘され、生体影響が懸念されている。

合成高分子素材由来の化学物質は、直接的な暴露による生体影響も懸念され、リスク評価の必要性が挙げられており、その暴露量評価が要求されている。また、「優先してリスク評価に取り組む物質のリスト：環境省」や「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会：厚生労働省」でリスク評価が注目されている物質である。

一般に環境汚染化学物質のリスク評価は、安全性及び暴露評価から判定される。しかし、EDCsに関しては、安全性評価（毒性試験）において、低用量問題や多世代影響など多くの問題を抱え、具体的な結論等はされていない。従ってEDCsの生体影響の解析については、当該化学物質のリスク評価が究極の課題であり、医学、薬学のみならず、疫学、公衆衛生学、衛生工学等の専門家が学際的に取り組む必要がある。特に、ヒトがどの程度、EDCsに暴露されているかを評価し、その値を参考に安全性試験を実施する必要性が望まれている。このためには、早急にヒト暴露量を算出する必要があり、生体試料中のEDCsを測定することが大きな課題となっている。

本研究においては、暴露量の多さから注目されているフェノール性エストロゲン活性化学物質の中から、特にビスフェノールA(BPA)及びノニルフェノール(NP)に注目し、高感度且つ高精度な分析法を開発し、ヒト暴露量評価に応用した。

当該化学物質は、従来ppmオーダーの分析法が一般的であり、ヒト生体試料などを対象としたppb以下の低濃度試料の測定については分析法が報告されていなかった。

本研究では、液体クロマトグラフィー/電気化学検出法(LC-ED)や液体クロマ

トグラフィー/質量分析法(LC-MS)を用いた高感度な分析法を開発し、ppbレベルの超微量分析法を構築した。又、測定対象化学物質がいずれも試料採取・保存を含めた測定環境から汚染されることを確認し、その改善策を種々検討した結果、信頼性ある精度の高い分析法の開発に成功している。

更に、構築した本分析法を用いて、BPA及びNPのヒト暴露量評価を検討している。一般に環境汚染化学物質のヒト暴露量を算出する場合、2つの暴露評価手法が採用されている。一つは、摂取媒体における当該化学物質の存在量を求め、暴露量を算出する手法である。もう一つのアプローチは、ヒト生体試料を分析して暴露量を推測するものである。構築した分析法を利用して、摂取媒体（水、空気）からの暴露量を算出した結果、BPAの暴露量は、約14 ng/kg/day、NPは180ng/kg/dayという推定値が得られた。この値の妥当性を種々評価した結果、特に、暴露媒体から当該化学物質を高濃度摂取した場合、ヒト暴露量を過小評価するリスクを明らかにした。

そこで、学位論文ではヒト生体試料中のBPA及びNPに関するバイオマーカー（代謝物）にターゲットを絞り、ヒト暴露量評価への応用を検討している。その結果、当該化学物質の生体試料中の濃度を把握することは、ヒト暴露量評価のバイオマーカーとして有用であることを明らかにした。

本研究で開発された分析法及び得られた知見は、生活環境汚染化学物質と疾病との因果関係の究明を目的とした疫学調査との学際的な研究として展開することにより、高分子素材由来フェノール性化学物質（BPA及びNP）の暴露に伴う代謝機能等の影響を解明し、リスク評価を実施する上で大きく寄与するものと期待される。

従って、本論文は、博士（薬学）を授与するに十分値するものと判定した。